

## 自己評価報告書

平成23年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20590444

研究課題名 (和文) 腸炎ビブリオの鉄獲得受容体蛋白質の解析と特異的増殖阻止剤の開発

研究課題名 (英文) Development of monoclonal antibody which inhibits growth of *Vibrio parahaemolyticus*.

## 研究代表者

中尾 浩史 (NAKAO HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20237217

研究分野：細菌学、生化学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学 (含真菌学)

キーワード：シデロフォア、腸炎ビブリオ、モノクローナル抗体

## 1. 研究計画の概要

腸炎ビブリオは日本では細菌性食中毒の主要原因菌の一つであり、病原性を発揮するために優れた鉄獲得機構を持つ。申請者らは、腸炎ビブリオが鉄と特異的に結合するキレーターであるシデロフォア・ビブリオフィリンを体外に分泌し、鉄・ビブリオフィリン複合体を PvuA という受容体蛋白を介して取り込む系があることを見だし、鉄制限に応じた発現制御が行われていることについて明らかにしてきた。今回、申請者は、PvuA の機能を蛋白質化学的に明らかにし、病原性への関与の証明、鉄取り込み阻害剤の開発を目的に、次の検討を行う。(1)PvuA の変異蛋白質を作製し、鉄の取り込みに必要な部位を決定する、(2)PvuA の大量発現株を作製することにより PvuA を大量発現させた後、結晶化し、その X 線結晶構造解析を行う、(3)鉄取り込みを阻害する抗 PvuA モノクローナル抗体の調製およびエピトープの解析を行う。

## 2. 研究の進捗状況

本菌のビブリオフィリンと病原性との関連について明らかにするために、*in vivo*における病原性の測定法の開発を行った。感染モデ

ルとしてショウジョウバエおよびカイコを用いた。ショウジョウバエとカイコは自然免疫を有しており、腸管感染症のモデルとなる。これらに腸炎ビブリオ懸濁液を注入し、経時的に生存数を測定すると致死に至るまでの時間によって致死活性を評価できることが明らかとなった。この系を用いることにより、ビブリオフィリン非産生株においては著しく致死活性が低下すること、および、ショウジョウバエの腸管中においてビブリオフィリン非産生株の増殖が低下していることを見出している。

次に、ビブリオフィリンを介した鉄取り込み系について検討を行った。本菌はビブリオフィリンを遊離し、鉄と結合したその複合体を特異的な受容体を介して取り込み、利用する。この受容体を介した取り込み系を阻害することはビブリオの増殖阻害剤の開発につながる。そこで、次の3種類の抗原を用いてモノクローナル抗体を作成することとした。抗原には(1)鉄制限状態における腸炎ビブリオの外膜蛋白(2)ビブリオフィリン特異的受容体であるPvuAの菌体外に露出していると予想される部分のペプチド(3)PvuAの大量産生株を作成し、精製したPvuA、である。その結果、鉄制限下の外膜を抗原としたモノクローナル

抗体4株、ペプチドを抗原とした場合、1株が得られた。現在、これらのクローンの性質について検討している。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

ビブリオフィリンが宿主体内での増殖に深く関与していることが明らかになり、外膜蛋白質に対するモノクローナル抗体も数クローン得られている

### 4. 今後の研究の推進方策

モノクローナル抗体のクローン数を増やすとともに得られたクローンの諸性質を明らかにしていく。

研究代表者が4月より琉球大学へ転任となったため、新たな施設における研究環境の整備に時間がかかり、若干の計画の見直しが必要になることが予想される。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Miyoshi, S., Abe, Y., Senoh, M., Mizuno, T., Maehara, Y., and Nakao, H. Inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin through mutation of the N- or C-terminus of the lectin-like domain. *Toxicon* 査読有 57(6), 904-908. (2011)
2. Miyoshi, S., Sasaki, T., Kaku, N., Inoue, T., Uozumi, N., Maehara, Y., and Nakao, H. Assimilation of metal ions bound to porphyrins or phrphyrin-peptides by *Vibrio vulnificus*. *Biocontrol Sci.* 査読有 15, 1-6. (2010)
3. Mizuno, T., Sultan, S.Z., Kaneko, Y., Yoshimura, T., Maehara, Y., Nakao, H., Tsuchiya, T., Shinoda, S., Miyoshi, S. Modulation of *Vibrio mimicus* hemolysin through limited proteolysis by an endogenous metalloprotease. *FEBS Journal* 査読有 276, 825-834. (2009)
4. Funahashi, T., Tanabe, T., Shiuchi,

K., Nakao, H. and Yamamoto, S. Identification and Characterization of Genes Required for Utilization of Desferri-Ferrichrome and Aerobactin in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32, Biol. Pharm. Bull. 査読有 32(3), 359-365. (2009)

[学会発表] (計 13 件)

1. 山科竜一、山田真人、田邊知孝、高橋栄造、山本重雄、岡本敬の介、三好伸一、中尾浩史 腸炎ビブリオのvibrioferrinを介する鉄獲得系と病原性 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会平成 22 年 10 月 16-17 日 (愛媛・松山)
2. 山田真人、田邊知孝、高橋栄造、山本重雄、岡本敬の介、三好伸一、中尾浩史 腸炎ビブリオのシデロフォア, vibrioferrin を介する鉄獲得系と病原性 第 48 回日本薬学会中国四国支部学術大会平成 21 年 11 月 7-8 日 (徳島)
3. 山田真人、高橋栄造、岡本敬の介、田邊知孝、山本重雄、中尾浩史 腸炎ビブリオの産生するシデロフォア, vibrioferrin と病原性 第 129 回日本薬学会年会 (京都) 平成 21 年 3 月 26-28 日 京都
4. 田邊知孝、舟橋達也、中尾浩史、山本重雄 腸炎ビブリオの vibrioferrin を介する鉄獲得系の分子遺伝学的研究 第 129 回日本薬学会年会 平成 21 年 3 月 26-28 日 (京都)
5. 舟橋達也、田邊知孝、氏内圭一、中尾浩史、山本重雄 腸炎ビブリオにおける外因性シデロフォア ferrichrome 及び aerobactin 輸送系の解析 第 129 回日本薬学会年会 平成 21 年 3 月 26-28 日 (京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]